

Vergleichende Untersuchungen
zur Aktivität der alkalischen Phosphatase (Substrat:
p-Nitrophenylphosphat) und der Paraoxonase (Substrat:
O,O-Diäthyl-O-(p-Nitrophenyl)-phosphat) menschlicher Seren

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt
von
Thomas Schewior



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548402_0048

Aus dem Institut für Rechtsmedizin der Universität
Erlangen - Nürnberg
Direktor: Prof. Dr. Dr. E. Weinig

Vergleichende Untersuchungen
zur Aktivität der alkalischen Phosphatase (Substrat:
p-Nitrophenylphosphat) und der Paraoxonase (Substrat:
O,O-Diäthyl-O-(p-Nitrophenyl)-phosphat) menschlicher Seren

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt

von

Thomas Schewior

aus

Grünweide / OS

Mit Erlaubnis der medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg

Dekan:

Professor Dr.med.W.Schieser

Referent:

Professor Dr.Dr.M. Geldmacher-v.Mallinckrodt

Tag der mündlichen Prüfung: 13.7.1971



Inhaltsverzeichnis

	Seite
A) <u>Einleitung</u>	4
1. Paraoxonase	5
2. Alkalische Phosphatase mit besonderer Berücksichtigung des intestinalen Isoenzym	11
B) <u>Problemstellung</u>	15
C) <u>Experimentelle Untersuchungen</u>	16
1. Bestimmung der Aktivitäten beider Enzyme in Seren nüchterner Versuchspersonen	16
2. Versuch mit fettreicher Probemahlzeit	16
3. Bestimmung der ABO-Blutgruppen	16
4. Enzymvergleich bei krankhaft veränderter Leber	17
D) <u>Meßmethodik</u>	18
1. für die Paraoxonase	19
2. für die alkalische Phosphatase	21
E) <u>Ergebnisse und statistische Auswertung</u>	23
a) Vergleich der EP- und AP-Aktivitäten	23
b) Verteilung der EP-Aktivitäten	27
c) Verteilung der AP-Aktivitäten	30
d) Verhalten der Enzyme nach fettreicher Probemahlzeit	32
e) Enzymaktivitäten von AP und EP im Hinblick auf die Blutgruppenzugehörigkeit im ABO-System	32
f) Enzymaktivitäten von AP und EP im Vergleich bei Leberzirrhose und akuter Hepatitis	37
F) <u>Diskussion</u>	39
G) <u>Zusammenfassung</u>	42
H) <u>Literaturverzeichnis</u>	43

A) E i n l e i t u n g

In dieser Arbeit werden einige Untersuchungen zu der Frage durchgeführt, ob an der enzymatischen Hydrolyse von E 600 (O,O-Diäthyl-O-(p-Nitrophenyl)-Phosphat Isoenzyme der alkalischen Phosphatase *) beteiligt sind.

Die Phosphatasenbeteiligung hat Aldridge (1952) bereits in den Anfängen der Enzymanalyse der E 600-Spaltung in Erwägung gezogen und damals negativ beantwortet. Gestützt war seine Aussage allerdings nur auf die Einzelergebnisse von Serum- und Gewebeuntersuchungen (Galle und Niere) bei zwei Kaninchen.

Inzwischen konnte über den Abbau von E 600 eine Reihe neuer Erkenntnisse gewonnen werden, worüber in einem kurzen Überblick nachfolgend berichtet wird.

Auch in der Erforschung der alkalischen Phosphatase sind hinsichtlich der organ- und substratspezifischen Isoenzyme große Fortschritte gemacht worden, vor allem nachdem Beckman (1964) erstmals die elektrophoretische Charakterisierung des intestinalen Phosphatasen-Isoenzym gelungen war.

Den erneuten Anstoß, weiter nach einer Phosphatasen-Beteiligung beim Abbau von E 600 zu suchen, gibt insbesondere der von Krisch (1968) aufgezeigte Polymorphismus in der enzymatischen E 600-Spaltung, wonach die Fermentaktivität eine Trennung der Seren in zwei Gruppen erkennen läßt. Da Geldmacher-von Mallinckrodt, Rabast und Lindorf (1969) bei ihren Arbeiten mit E 600 ebenfalls

*) System. Bez.: Orthophosphorsäuremonoesterphosphohydrolase (3.1.3.1.) definiert in Report of the Commission on Enzymes of the IUB bei M. Florkin und E.H. Stotz, Comprehensive Biochemistry 13, S. 6; Elsevier Publishing Comp., New York, 1964

einen Polymorphismus - und zwar bezüglich der Vergiftbarkeit menschlicher Serum-Cholinesterase durch E 600 - fanden, und darüber hinaus Geldmacher-von Mallinckrodt, Baumgartner, Burgis und Metzner (1971) eine deutliche Korrelation beider Polymorphismen nachweisen konnten, gewinnt die Frage nach dem Einfluß der alkalischen Phosphatase auf den Abbau von E 600 zusätzliches Interesse.

1. Paraoxonase

Die Mitteilung von Roche (1950), daß Triester der Orthophosphorsäure zwar leicht durch Säuren und Basen und sogar durch kochendes Wasser gespalten, jedoch nicht enzymatisch hydrolysiert werden, wurde von Aldridge (1953; 1,2) widerlegt. Aldridge (1953; 1) fand, daß sich die Esterase, welche p-Nitrophenylazetat, p-Nitrophenylpropionat und p-Nitrophenylbutyrat spaltet, in zwei Typen unterteilen läßt, wenn eine Präinkubation mit E 600 als Hemmstoff durchgeführt wird.

Beim einen Typ erfolgt bis hinauf zu einer Konzentration von 10^{-3} des E 600 keine Hemmung. Dieser Esterasetyp erhielt von Aldridge die Bezeichnung A-Esterase, da er Azetat-Ester bei allen Seren verschiedener Tiergattungen am besten spaltet.

Der andere Esterasetyp wird bereits durch E 600 in 10^{-6} M Konzentration vollständig gehemmt und wurde von Aldridge wegen der meist höheren Affinität zu Butyrat als B-Esterase bezeichnet.

In weiteren Untersuchungen an Kaninchen, Ratte und Pferd konnte Aldridge (1953; 2) die Identität des von ihm als

A-Esterase gekennzeichneten Enzyms mit der E 600 spaltenden Esterase zeigen. Diese Identität leitete Aldridge aus folgenden Ergebnissen ab:

A-Esterase und E 600-Esterase sind gegenüber den gleichen Hemmstoffen empfindlich.

Keines der beiden Enzyme wird durch Eserin gehemmt.

Die Hemmung der enzymatischen Hydrolyse von p-Nitrophenylazetat und E 600 ist prozentual gleich, wenn als hemmende Substanz Diäthylphenylphosphat eingesetzt wird, welches wegen seiner dem E 600 verwandten Struktur das aktive Zentrum der E 600-Esterase besetzt.

Das Aktivitätsverhältnis für beide Substrate ist bei den Seren einer Tierart immer konstant.

Main (1960; 1) arbeitete ein Reinigungsverfahren zur Darstellung von E 600 spaltendem Enzym (Paraoxonase) aus und charakterisierte dieses Ferment mit Hilfe von Schafserum (1960; 2). Das Ergebnis seiner Arbeit war eine Einschränkung der Feststellung von Aldridge (1953; 2), daß es sich bei A-Esterase und E 600-Esterase um ein identisches Enzym handle, das lediglich von Tierart zu Tierart wechselnde Affinität zu den Substraten p-Nitrophenylazetat und E 600 habe.

Eine Enzymreinigung ergab nämlich, für das Schafserum eine Änderung des Aktivitätsverhältnisses um den Faktor 7. Auch durch Hitze-Inaktivierung traten Unterschiede hervor; und zwar besaß die Aktivität für p-Nitrophenylazetat höhere Thermostabilität (Restaktivität von 25 % gegenüber 3 % für E 600).

Durch Eiweißfraktionierung von menschlichen Seren und Testung der Fraktionen unter anderem mit den Substraten

Tabun (Dimethyl-amido-äthoxy-phosphoryl-Cyanid) und E 600 fanden Augustinsson und Heimbürger (1954), daß Fraktion IV-1 diese Substrate am besten spaltete. E 600 wurde sogar ausschließlich von dieser Eiweißfraktion gespalten.

Aus Summationsexperimenten am Kaninchenserum war bei Verwendung einfacher und doppelter Mengen von Tabun und E 600 zu ersehen, daß wahrscheinlich zwei Enzyme vorhanden waren, von denen jedes sowohl Tabun als auch E 600 spaltet.

Scrinjaric-Spoljar und Reiner (1968) teilten ihre Untersuchungen zur Spaltung von E 600 und Armin (O-Äthyl, O-(p-nitrophenyl)-äthylphosphonat) mit, die sie nach Eiweißfraktionierung von menschlichem Serum durchführten: Die Fraktion IV-1 ergab höhere Hydrolysewerte für E 600 als für Armin. Dagegen zeigte sich für beide Substrate die Eiweißfraktion IV-1 sehr thermolabil. Deshalb nehmen die Autoren das Vorhandensein von mehr als nur einem E 600 spaltendem Enzym als sicher an. Nativseren enthalten nach ihrer Ansicht zusätzliche Paraoxynase, da sich mit ihnen meistens eine über die Summe der Fermentaktivität beider Eiweißfraktionen hinausgehende E 600-Spaltung erzielen ließ.

Schließlich beschrieb Krisch (1968) die kinetischen Eigenschaften eines Enzyms in Bezug auf die Hydrolyse von E 600. Er charakterisierte diese E 600-Esterase durch

die Michaeliskonstante (K_M zwischen $2,5$ und $5,7 \cdot 10^{-4}$ bei sieben gesunden Versuchspersonen),

den Einfluß von Inhibitoren, wobei typische Hemmstoffe der B-Esterase ohne Wirkung blieben,

die Aktivitätssteigerung des Enzyms um etwa 40 % nach Zugabe von Calcium,

die Bestimmung des pH-Optimums zwischen 11,0 und 11,6.

Von besonderem Interesse in der Arbeit von Krisch ist die Feststellung, daß dieses Enzym biologischerweise in einem breiten Bereich streut. Der Nachweis hierfür wurde mit Hilfe der Seren von 50 Versuchspersonen geführt. Wochenlange Kontrollen bei zwei Personen ergaben, jeweils gleichbleibende Enzymwerte, daher können diese als individuell festgelegt und gut reproduzierbar gelten. In der Darstellung logarithmisch-normaler Verteilung der Normalwerte fanden sich bei den 25 weiblichen und 25 männlichen Versuchspersonen zwei sich überlagernde Gruppen einerseits hoher, andererseits niedriger Enzymaktivität. Geschlechtsbezogene Unterschiede ergaben sich nicht. Krisch muß die Frage offen lassen, ob die verschiedenen hohen Enzymaktivitäten dieser beiden Gruppen durch quantitative Unterschiede des gleichen Enzymproteins oder durch das Vorliegen von zwei qualitativ verschiedenen Enzymproteinen verursacht werden; denn der relativ breite Bereich der K_M -Werte ($2,5 - 5,7 \cdot 10^{-7}$) einerseits und die Breite des Überlagerungsbereiches der beiden Aktivitätsgruppen andererseits ließen eine definitive Aussage nicht zu. Unter Hinweis auf die Genetik der Pseudocholinesterasen des Serums hält Krisch aber eine genetische Determinierung der Unterschiede für möglich.

Der enzymatische Abbau von E 600 spielt auch eine wichtige toxikologische Rolle für das Ausmaß und die Dauer der Vergiftung von Cholinesterase durch E 600.

Kewitz (1957) führte Versuche über die in-vitro-Vergiftung von Cholinesterase durch DFP (Di-isopropyl-fluorophosphat), E 605 und E 600 an Versuchstieren durch. Er fand rasche Reaktivierung der vergifteten Cholinesterase, wenn er E 600 nahm, dagegen anhaltende Vergiftung bei Verwendung von DFP.

Einen entsprechenden Hinweis auf einen spontanen Abbau von E 600 lieferte auch das Ergebnis von Friedberg und Sakai (1958):

Nach Lagerung E 600-vergifteter Kleinhirn- und Bluthomogenate von Versuchstieren während mehrerer Tage, war eine sehr viel höhere Cholinesteraseaktivität als unmittelbar nach dem Tode festzustellen. Diese Erscheinung trat nach Tötung der Tiere mit Systox (Diäthylthiophosphorsäureester des Äthylthioglykols, "E 1059") oder Isoysystox nicht auf.

Gleichartige Ergebnisse brachten in-vitro-Versuche mit Pferdeserum von Friedberg und Erdmann (1959): mit E 600 in $5 \cdot 10^{-7}$ M Konzentration vergiftete Cholinesterase erlangte im Laufe von 15 Tagen bis etwa 60 % ihrer Normalaktivität wieder, während diese spontane Reaktivierung für Versuche mit Systox oder Isoysystox nicht beobachtet werden konnte. Für diese Reaktivierungsvorgänge konnten die Untersucher den schnellen enzymatischen Abbau von E 600 im Serum wahrscheinlich machen.

Zur Charakterisierung der Toxizität von E 600 führten Geldmacher-von Mallinckrodt, Rabast und Lindorf (1969) Untersuchungen mit menschlichen Seren durch. Die Inkubation mit E 600 in einer molaren Konzentration von $3,2 \cdot 10^{-8}$ brachte keine völlige Inaktivierung, sondern ließ eine Restaktivität der Azetylcholin spaltenden Fermente zurück. Diese Restaktivität war unterschiedlich und schon bei 50 Seren in drei abgegrenzte Gruppen differenzierbar.

(Nachfolgend Tabelle 2 aus dieser Arbeit)

Tabelle 2. Normalaktivität und Restaktivität nach Vergiftung von 50 menschlichen Serumproben mit E 600 ($c = 3,2 \times 10^{-8}$ molar) sowie Aufteilung der Seren in 3 Gruppen

Gruppe	Anzahl der Personen	davon		Restaktivität nach Vergiftung in % d. Normalaktivität	Prozentualer Anteil d. Gruppe	Normalaktivität in $\mu\text{l CO}_2/6\text{min}$ und 0,05 ml Serum
		o.	♀			
I	30	19	11	0 - 5,5	60 %	122 - 250
II	10	3	7	13 - 20,5	20 %	135 - 235
III	10	7	3	29 - 48	20 %	130 - 272

Da die gemessenen Restaktivitäten unabhängig von den Ausgangsaktivitäten waren, diskutierten die Autoren, ob der Polymorphismus der Restaktivitäten nicht dadurch zustande komme, daß während des Vorgangs der Vergiftung durch E 600 gleichzeitig eine unterschiedlich rasche Hydrolyse eben dieses Giftes vor sich geht.

Vergleichsuntersuchungen von Baumgartner (1970) ergaben bereits eine weitgehende Bestätigung dieser Vermutung: es hatten nämlich Seren mit niedriger Cholinesteraseaktivität stets auch eine niedrige Aktivität für das E 600 spaltende Enzym nach Krisch (1968). Diese Beziehung ließ sich in einem Korrelationskoeffizienten von 0,68 ausdrücken.

2. Alkalische Phosphatase mit besonderer Berücksichtigung des intestinalen Isoenzym

Die alkalische Phosphatase des menschlichen Serums setzt sich aus Isoenzymen zusammen, die sich nach Organherkunft und Substratspezifität bis zu einem gewissen Grade von einander trennen lassen. Hierüber haben Fishman und Ghosh (1967) in einer Übersichtsarbeit mit Ausführlichkeit berichtet. Als wesentlichstes Ergebnis der zahlreichen Forschungen von Fishman und seinen Mitarbeitern (siehe hierzu den Literaturindex bei Fishman und Ghosh, 1967) kann gelten, daß die im menschlichen Serum vorhandene alkalische Phosphatase - von Schwangeren und Menschen mit Leber- und Knochenerkrankungen abgesehen - zum größten Teil dem Intestinum entstammt. Die Orte größter Phosphatasenkonzentration sind stets resorbierende Endothelzellen. Im Intestinalgewebe ist demgemäß die alkalische Phosphatase in den Mikrovilli des Endothels besonders aktiv (Plosskove, Berg und Segal, 1963).

Alkalische Phosphatase ist am transzellulären Stofftransport beteiligt; ihr intestinales Isoenzym erreicht über den Ductus thoracicus den venösen Kreislauf (Keiding 1966).

Folgende wesentliche Kennzeichen sind für das intestinale Phosphataseisoenzym beschrieben worden:

Hemmbarkeit durch L-Phenylalanin:

Bei Verwendung von Phenylphosphat als Substrat (0,018 molare Konzentration) und L-Phenylalanin als Hemmstoff (0,005 molare Konzentration) ist intestinales Isoenzym zu 77 % (Fishman, Green und Inglis, 1963) hemmbar, während die Hemmbarkeit für Leber-, bzw. Knochenphosphatase nur 8 % bzw. 10 % beträgt (Fishman und Ghosh, Tabelle 4, Übersichtsarbeit).

Diese in ihrer Hemmbarkeit für das intestinale Isoenzym typische Fraktion trägt den Namen LPSAP (= L-Phenylalanin sensitive alkaline phosphatase).

Langsame elektrophoretische Wanderung:

Fishman und Kreisher (1963) verwendeten die Hemmbarkeit durch L-Phenylalanin als Merkmal für intestinales Isoenzym und fanden, daß die in der Elektrophorese langsamer wandernde Phosphatasenbande dem Intestinum entstammt.

Beziehung zum ABO-Blutgruppensystem:

Schon früher war diese langsamer wandernde Phosphatasebande in der Elektrophorese ohne Kenntnis ihrer Organherkunft wegen ihrer ABO-Blutgruppenkorrelation beschrieben worden. Bamford, Harris, Luffman, Robson und Cleghorn (1965) teilten mit, daß die langsamer wandernde Zone gehäuft bei den Blutgruppen O und B vorhanden ist und bei der Blutgruppe A meistens fehlt.

Beckman (1964) gab darüber hinaus an, daß es immer Ausscheider von ABH-Blutgruppensubstanzen sind, welche die langsame Zone in der Elektrophorese aufweisen.

Aktivierung bei fettreicher Diät:

Langman, Leuthold, Robson, Harris, Luffman und Harris H. (1966) bemerkten deutliche Intensitätsschwankungen dieser blutgruppenkorrelierten langsam wandernden Elektrophoresebande. Aus Untersuchungen von Gould (1964) war ihnen der Einfluß von fettreicher Nahrung auf die Aktivitätszunahme der Serumphosphate bei Ratten bekannt. Fishman, Green und Inglis (1962) hatten hierfür die intestinale Herkunft nachgewiesen.

Langman und Mitarb. (1966) gaben ihren Versuchspersonen fettreiche Diät und stellten eine Erhöhung der Aktivität der alkalischen Phosphatase fest, deren Maximum etwa nach 7 Stunden erreicht war. Die Elektrophorese bei diesem Diätversuch ergab im Vergleich zu den Nüchternseren ein erstmaliges oder verstärktes Auftreten der langsam wandernden Bande. Insbesondere verdeutlichte sich auch die schon für die Nüchternseren gegebene Korrelation zu den ABO-Blutgruppen. Auch die Bestimmung der Gesamtaktivität der Phosphatase im Serum (mit der Methode nach King-Armstrong, 1934, die Phenylphosphat als Substrat verwendet) ergab einen fettbedingten Anstieg, der für alle ABO-Blutgruppen vorhanden und für die Blutgruppen O und B geringfügig deutlicher war.

Nach Geldmacher-von Mallinckrodt und Lindorf (1969) ist diese für die alkalische Phosphatase gültige Korrelation zu den ABO-Blutgruppen für die drei Typen unterschiedlicher Cholinesteraserestaktivität nach E 600-Vergiftung nicht gegeben. Das Fehlen einer solchen Beziehung schließt jedoch nicht ohne weiteres aus, daß intestinales Phosphatasen-Isoenzym am Abbau von E 600 beteiligt sein könnte. Es ist nämlich in diesem Zusammenhang beachtenswert, daß bisher histochemische Experimente mit postmortal entnommener (Shreffler, 1966), bzw. mit intra operationem exzidiierter intestinaler Mukosa (Langman, Constantinoupolous und Bouchier, 1968) keine Unterschiede in der geweblichen Phosphatasekonzentration für die einzelnen Gruppen des ABO-Systems sichern konnten.

Ein weiteres Phänomen, das von Fishman und Ghosh (1967) beschrieben wurde, ist in diesem Zusammenhang ebenfalls zu berücksichtigen: Es wurden L-Phenyl-

alaninhemmbarkeit, Hitzeempfindlichkeit und ABO-Blutgruppenzugehörigkeit in Beziehung gesetzt. Die Verteilungsverhältnisse zeigten dabei, daß auch Individuen der Blutgruppe A intestinales Phosphatasenisoenzym in das Serum abgeben. Im Unterschied zu den Blutgruppen B und O geht jedoch offensichtlich die labile Hemmbarkeit durch L-Phenylalanin bei Übertritt in die Blutbahn für die Blutgruppe A rascher verloren, und damit auch die direkte Nachweisbarkeit der intestinalen Herkunft.

B) Problemstellung

Wie zu Anfang dieses kurzen Überblicks gezeigt wurde, haben die unter verschiedenen Aspekten vorgenommenen Untersuchungen zur Klärung des enzymatischen Abbaus von E 600 eine Fülle von Einzelheiten zur Fermentanalyse ergeben. Aber die Aussagen zur Substratspezifität sind noch uneinheitlich und die Ansätze zur Charakterisierung einer Paraoxonase aus enzymkinetischer Sicht lassen noch weitgehend den in jüngster Zeit gefundenen Polymorphismus des Abbaus von E 600 im menschlichen Serum außer Betracht.

Mit Rücksicht auf diesen Polymorphismus erscheint es sinnvoll, erneut die Frage zu stellen, ob Unterschiede im Bereich der alkalischen Phosphatase (bei Verwendung von p-Nitrophenylphosphat als Substrat) sich zu der breit streuenden Aktivität der E 600-Hydrolyse in Beziehung setzen lassen.

Bei ebendieser Frage nach dem Einfluß der alkalischen Phosphatase trugen wir der Auffassung Rechnung, daß die Serumphosphatase mit intestinaler Herkunft überwiege. Wir führten deshalb auch einen Versuch mit fettreicher Diät durch.

Weiterhin interessierte es uns, die ABO-Blutgruppenzugehörigkeit unserer Versuchspersonen sowohl mit der Typenverteilung des Abbaus von E 600 als auch der Serum-Gesamtaktivität der alkalischen Phosphatase in Beziehung zu setzen.

Nach unserer Erwartung sollten außerdem Enzymvergleiche die fragliche gegenseitige Beeinflussung dort deutlich zu erkennen geben, wo pathologisch hohe Werte der alkalischen Phosphate vorliegen. Hierzu zogen wir einige an Leberzirrhose und Hepatitis epidemica erkrankte Versuchspersonen heran.

C) Experimentelle Untersuchungen

1. Bestimmung der Aktivitäten beider Enzyme in Seren nüchterner Versuchspersonen:

Um von vorausgegangenen Mahlzeiten unbeeinflusste Ergebnisse bei den Enzymbestimmungen zu erhalten, nahmen wir von allen 59 Versuchspersonen eine Blutprobe um 8 Uhr ab, wobei eine Essenspause von 14 Stunden jeweils gesichert war.

2. Versuch mit fettreicher Probemahlzeit:

Nachdem die Blutentnahme bei Nüchternheit erfolgt war, gaben wir 25 Versuchspersonen entsprechend den Versuchen von Langman und Mitarb. (1966) je 60 g pflanzliches Öl (Marke Mazola), gebunden in 150 g Kartoffelsalat, zu essen. Zum Nachweis einer auf diese Weise gesteigerten Enzymaktivität entnahmen wir 4 bzw. 7 Stunden später eine zweite bzw. dritte Blutprobe.

3. Bestimmung der ABO-Blutgruppen

Weiterhin ließen wir bei 52 der Versuchspersonen die ABO-Blutgruppen bestimmen, um nach einem Zusammenhang zwischen diesem Blutgruppensystem und der E 600-Esterase-Aktivität zu suchen.

4. Enzymvergleich bei krankhaft veränderter Leber

Bei 9 Patienten mit Leberzirrhose bei denen die Diagnose histologisch gesichert war, und 8 Patienten mit Hepatitis epidemica führten wir ebenfalls Enzymaktivitätsmessungen durch. Dabei werteten wir sowohl die bei Nüchternheit als auch die 6 Stunden nach der klinischen Mittagkost entnommenen Blutproben aus.

Für unsere Untersuchungen stellten sich 23 Studentinnen und 36 Studenten der Universität Erlangen zur Verfügung. Diese Probanden, die sich im Alter von 20 bis 30 Jahren befanden, waren alle gesund, und es waren bei ihnen keine Funktionsstörungen der Leber zu erfragen.

Die Versuchspersonen mit Leberzirrhose bzw. Hepatitis epidemica waren im März 1970 Patienten der Medizinischen Klinik der Universität und des Waldkrankenhauses in Erlangen, sowie der Städtischen Krankenanstalten in Nürnberg.

Alle untersuchten Seren wurden sofort nach der mit Vakuumvenülen durchgeführten Blutentnahme durch Zentrifugieren abgetrennt und bis zur Auswertung höchstens 4 Tage in Tiefkühlung bei -18°C aufbewahrt.

D) Meßmethodik

Bei allen untersuchten Seren führten wir den Vergleich der Aktivitäten beider Enzyme mit Hilfe von zwei kinetischen Meßmethoden durch. Die kinetischen Enzymmeßverfahren (im englischen Sprachgebrauch: continous measurement), also die Verfahren, bei welchen der pro Zeiteinheit konstante Substratabbau die Meßgröße darstellt, haben gegenüber den Methoden mit einmaliger Messung (sampling methods) nach definierter Reaktionszeit mehrere Vorteile:

Ein am Anfang der Reaktion durch unbestimmte Aktivatoren verursachter sogenannter Bursteffekt mit kurzzeitig überschießender Enzymaktivität geht nicht in das Meßergebnis ein.

Dank der kurzen Inkubationszeit von im allgemeinen nicht mehr als fünf Minuten Dauer ist die Enzymdenaturierung gering.

Es ist keine Zugabe eines die Enzymaktivität nach Ablauf der Reaktionszeit hemmenden Reagens notwendig.

Es müssen keine die Meßwerte korrigierenden Leerproben mitgeführt werden.

Vom Probenmaterial werden nur sehr kleine Mengen benötigt.

Ansatz: In eine Photometer-Meßküvette werden pipettiert:
1,65 ml Puffer, plus
0,25 ml 1:5 verdünntes Serum, plus
0,60 ml E 600-Gebrauchslösung;

Messung: Es kommt in diesem Ansatz nach guter Durchmischung mit einem Plastikquirl zur kontinuierlichen Abspaltung von Nitrophenol aus E 600, das mit der gleichmäßig zunehmenden Extinktion im Filterphotometer bei 405 nm in Abständen von jeweils einer halben Minute zwischen der 60. und 180. Sekunde quantitativ erfaßt wird.

Auswertung: Die Extinktionszunahme während der Dauer von zwei Minuten ergibt nach folgender Formel die Enzymaktivität in U/l Serum:

$$\begin{aligned}\text{Aktivität} &= \frac{E_{60-180} (\text{sec.}) \cdot 10^4 \cdot 2,4 \cdot 20}{0,1805 \cdot 2} \\ &= E_{60-180} (\text{sec}) \cdot 1330 (\text{U/l Serum})\end{aligned}$$

2) Meßmethode für die Aktivität der alkalischen Phosphatase nach Hausamen, Rick, Groß und Helger (1967)

(In der weiteren Darstellung wird die alkalische Phosphatase durch die Abkürzung "AP" gekennzeichnet.)

Puffer *) 0,1 M Diäthanol-HCl-Puffer pH 9,8
lösung: mit $5 \cdot 10^{-2}$ M $MgCl_2$

Puffer *) Zugabe einer gebrauchsfertigen Substrat-
Substrat: Tablette zu 10 ml Puffer ergibt eine
 $1,5 \cdot 10^{-2}$ M p-Nitrophenylphosphatlösung

Ansatz: In eine Photometer-Meßküvette werden pipettiert:
 2,0 ml Puffer-Substrat plus
 0,02 ml Serum

Messung: Auch hier wird die pro Zeiteinheit konstante
 Abspaltung von p-Nitrophenol als Ausdruck
 der Enzymaktivität quantitativ erfaßt.
 Die Extinktionszunahme wird in Abständen von
 30 sec. während 3 Minuten im Filterphotometer
 (Modell Eppendorf) bei 405 nm registriert.

Auswertung: Die Extinktionsdifferenz pro Minute wird in
 folgende Berechnungsformel eingesetzt:

Aktivität = $E_{60} \text{ (sec.)} \cdot 5460 \text{ (U/l Serum)}$

*) Pufferlösung und Substrat gebrauchsfertig in Merckotest: "Alkalische Phosphatase, Kinetischer Test", Art. Nr. 3314.

Bei beiden Meßmethoden wurde so verfahren, daß zunächst die erforderlichen Mengen von Puffer- und Substratlösung in drei Küvetten gefüllt wurden. Unter Kontrolle der Stoppuhr wurden sodann zum Zeitpunkt Null und nach 10 und 20 Sekunden drei Küvetten nacheinander mit Serum beschickt. Ab der 60. Sekunde wurden dann die Extinktionen reihum in der Reihenfolge der Serumzugabe gemessen, und dabei die 10-Sekunden-Abstände dieser zeitlichen Versetzung genau berücksichtigt. Diese Verschränkung der Reaktionszeiten in den einzelnen Küvetten ergab ohne zusätzlichen Zeitaufwand mehr Vergleichsdaten zur Bestimmung eines Mittelwertes.

Bei beiden Meßverfahren wurde auf Konstanz der Temperatur (25° C) geachtet, und die Temperatur jeweils vor Meßbeginn in den Küvetten selbst kontrolliert.

E) E r g e b n i s s e u n d s t a t i s t i s c h e A u s w e r t u n g

a) Vergleich der EP- und AP-Aktivitäten

Ein Zusammenhang zwischen beiden Enzymaktivitäten ist nicht erkennbar. In Tabelle 1 sind die gemessenen Werte nach steigender EP-Aktivität aufgestellt; die Werte der AP-Aktivität derselben Werte sind zugeordnet.

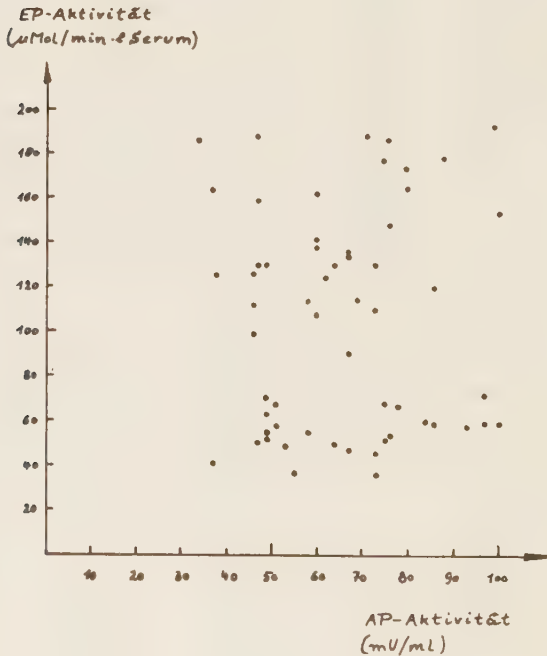
Tabelle 1 EP-Aktivität bei 59 Versuchspersonen in steigender Reihenfolge und die zugehörigen AP-Werte, sowie die Blutgruppe im ABO-System bei 52 zufällig gewählten Probanden.

Versuchsperson	EP-Aktivität in μ Mol p-Nitrophenol/ Min u. l Serum (Krisch, 1968)	AP-Aktivität in mU/ml Serum (Hausamen und Mitarb., 1967)	Blut- gruppe im ABO- System
Kienlein	36	55	A
Vogel	36	73	O
Neke	41	37	O
Adler	45	73	A
Gericke	46	67	B
Zenger	48	53	A
Barth	49	64	O
Stangl	49	47	A
Wieluch	50	75	A
Egger	51	49	A
Kreuzer	53	76	O
Dietrich	54	58	O

Nella	54	49	O
Butzler	57	51	A
Ebert	57	93	
Birk	51	100	O
Bopp	58	86	
Wolst	58	97	O
Wolfrum	59	84	
Müller Kl.	62	49	O
Distler	66	78	B
Schewior	67	75	O
Stumpf	67	51	A
Baumgartner	70	49	
Opitz	71	97	A
Kersch	75		
Bodenstein	89	67	O
Bien	98	46	A
Bauer	106	60	O
Kinkel	109	73	A
Manz	111	46	O
Awender	113	58	A
Schulz	113	69	A
Woyke	118	86	B
Wieck	123	62	
Herold	125	46	O
Strobel	125	38	A
Hußla	129	49	B
Müller C.	129	73	A
Peuten	129	64	O
Faulbaum	129	47	B
Luschka	133	67	B
Reinhardt	134	67	A
Clement	137	60	O
Ellwein	140	60	B

Ott	147	76	O
Niermann	152	100	O
Mang	158	47	A
Stiegler	161	60	O
Lutz	163	37	A
Nau	163	80	O
Döbbelin	173	80	O
Linsmeier	176	75	A
Tauchert	177	88	O
Rzehak	185	76	
Schürmann	185	34	A
Bosert	187	71	A
Scheu	187	47	A
May	191	99	O

Abb. 1 zeigt die EP-Aktivitäten als Funktion der AP-Aktivitäten bei 59 Versuchspersonen. Daraus wird eindeutig die stochastische Unabhängigkeit beider Enzyme ersichtlich.



EP-Aktivität in $\mu\text{Mol p-Nitrophenol/Min}$ und Liter Serum
(Krisch 1968)

als Funktion der AP-Aktivität in mU/ml Serum
(Rick und Mitarb. 1967)

b) Verteilung der EP-Aktivitäten

Die Meßwerte für die Aktivität der EP in den Seren von 59 gesunden, nicht verwandten Versuchspersonen zeigen eine drei-gipfelige Verteilung. Entsprechend der Tabelle 2 ist in der Abb. 2 die Summenhäufigkeit der EP-Aktivitäten pro Intervall von 10 Maßeinheiten dargestellt.

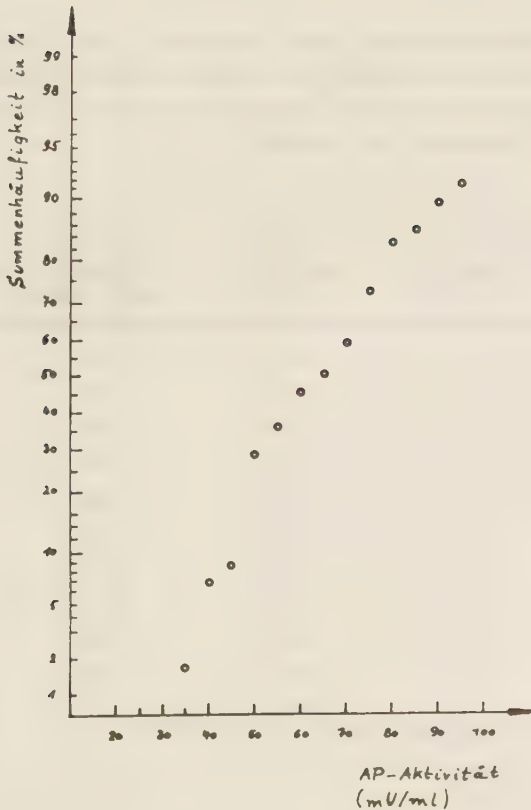
Tabelle 2 EP-Aktivitäten nach absoluter Häufigkeit, relativer Häufigkeit und relativer Summenhäufigkeit, jeweils auf Intervalle von 10 Maßeinheiten bezogen.

Meßintervall µMol/Min · 1 Serum	absolute Häufigkeit	relative Häufigkeit in %	relative Summenhäufig- keit in %
31 - 40	2	3,4	3,4
41 - 50	7	11,8	15,2
51 - 60	10	16,9	32,1
61 - 70	5	8,5	40,6
71 - 80	2	3,4	44,0
81 - 90	1	1,7	45,7
91 - 100	1	1,7	47,4
101 - 110	2	3,4	50,8
111 - 120	4	6,8	57,6
121 - 130	7	11,8	69,4
131 - 140	4	6,8	76,2
141 - 150	1	1,7	77,9
151 - 160	2	3,4	81,3
161 - 170	3	5,1	86,4
171 - 180	3	5,1	91,5
181 - 190	4	6,8	98,3
191 - 200	1	1,7	100,0

Drei Typen von Seren lassen sich also in Bezug auf ihre EP-Aktivität unterscheiden. Zwischen den Typen mit niedriger und mittlerer, bzw. niedriger und hoher Aktivität ergeben sich statistisch signifikante Unterschiede. Signifikanzbestimmung zwischen mittlerem und hohem Typ ist wegen der geringen Anzahl an Seren im hohen Meßbereich nicht möglich.

Abb. 2

Relative Summenhäufigkeit der AP-Aktivitäten in den Seren von 59 Versuchspersonen entsprechend Tabelle 2 im Wahrscheinlichkeitsnetz (Abszisse linear, Ordinate nach dem Gaus'schen Integral geteilt)



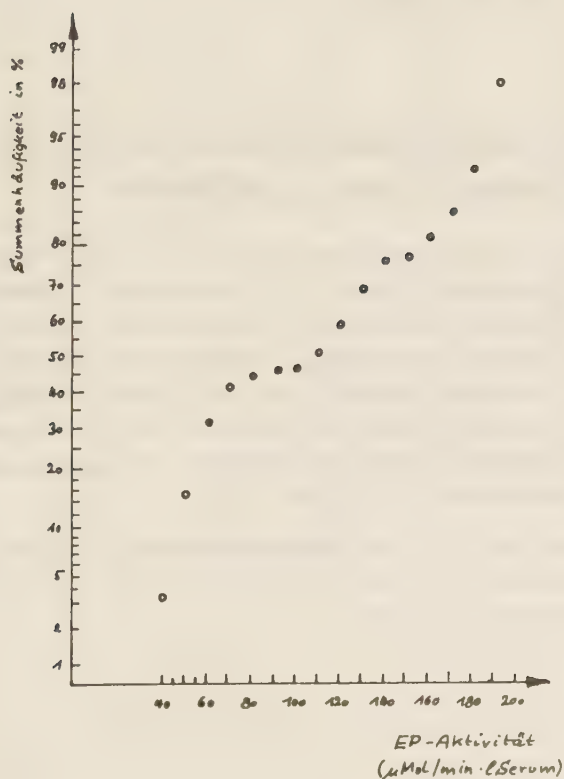
c) Verteilung der AP-Aktivitäten

Tabelle 3 und Abb. 3 stellen die Verteilung der AP-Werte über den gesamten Meßbereich dar. Eine normale statistische Verteilung kommt durch den an eine Gerade angenäherten Kurvenverlauf zum Ausdruck.

Tabelle 3 AP-Aktivitäten nach absoluter Häufigkeit, relativer Häufigkeit und relativer Summenhäufigkeit in %, jeweils auf Intervalle von 5 Maßeinheiten bezogen.

Meßintervalle mU/ml Serum	absolute Häufigkeit	relative Häufigkeit in %	relative Summenhäufig- keit in %
31 - 35	1	1,7	1,7
36 - 40	3	5,1	6,8
41 - 45	1	1,7	8,5
46 - 50	12	20,2	28,7
51 - 55	4	6,9	35,6
56 - 60	6	10,2	45,8
61 - 65	3	5,1	50,9
66 - 70	5	8,4	59,3
71 - 75	8	13,6	72,9
76 - 80	6	10,2	83,1
81 - 85	1	1,7	84,8
86 - 90	3	5,1	89,9
91 - 95	1	1,7	91,6
96 - 100	5	8,4	100,0

Abb. 3 Relative Summenhäufigkeit der EP-Aktivitäten in den Seren von 59 Versuchspersonen entsprechend Tabelle 3 im Wahrscheinlichkeitsnetz (Abszisse linear, Ordinate nach dem Gaus'schen Integral geteilt)



d) Verhalten der Enzyme nach fettreicher Probemahlzeit:

Der Diätversuch mit der 60 g pflanzliches Öl enthaltenden Probemahlzeit führte bei keinem der beiden Enzyme zu einer gegenüber den Ausgangswerten vermehrten Aktivität in den Seren, die 4 bzw. 7 Stunden später entnommen wurden. Schwankungen bis zu 5 %, die als Meßungenauigkeiten zu bewerten sind, traten bei allen Seren regellos über das Tagesprofil verteilt auf.

e) Enzymaktivitäten von AP und EP im Hinblick auf die Blutgruppenzugehörigkeit im ABO-System

Unter 52 Versuchspersonen befanden sich 22 mit Blutgruppe A, 23 mit Blutgruppe O und 7 mit Blutgruppe B (Tabelle 1). Die prozentuale Verteilung der Meßwerte für AP und EP innerhalb der Blutgruppen A und O (Tabellen 4 und 5) wird im Wahrscheinlichkeitsnetz dargestellt (Abb. 4 und 5). Dem größeren Anteil niedriger AP-Werte bei Blutgruppe A bzw. höherer AP-Werte bei Blutgruppe O entspricht der getrennte Kurvenverlauf in Abb. 4.

Der Kurvenverlauf für die Wahrscheinlichkeitsverteilung der EP-Werte (Abb. 5) der Blutgruppen A und O weist diesen Unterschied nicht auf.

Tabelle 4

Häufigkeitsverteilung für AP innerhalb der Blutgruppen A und O.

Intervall	absolute Häufigkeit Blutgruppe		relative Häufigkeit in % Blutgruppe		relative Summenhäufigkeit in % Blutgruppe	
	O	A	O	A	O	A
31 - 50	0	2	0,00	9,10	0,00	9,10
36 - 40	1	1	4,35	4,55	4,35	13,65
41 - 45	0	1	0,00	4,55	4,35	18,20
46 - 50	4	4	17,40	18,10	21,75	36,30
51 - 55	0	3	0,00	13,65	21,75	49,95
56 - 60	4	2	17,40	9,10	39,15	59,05
61 - 65	2	0	8,70	0,00	47,85	59,05
66 - 70	1	2	4,35	9,10	52,20	68,15
71 - 75	2	6	8,70	27,30	60,90	95,45
76 - 80	4	0	17,40	0,00	78,30	95,45
81 - 85	0	0	0,00	0,00	78,30	95,45
86 - 90	1	0	4,35	0,00	82,65	95,45
91 - 95	0	0	0,00	0,00	82,65	95,45
96 - 100	4	1	17,40	4,55	100,05	100,00

Tabelle 5

Häufigkeitsverteilung für EP innerhalb der Blutgruppe A und O.

Intervall	absolute Häufigkeit Blutgruppe		relative Häufigkeit in % Blutgruppe		relative Summenhäufigkeit in % Blutgruppe	
	O	A	O	A	O	A
31 - 40	1	1	4,35	4,55	4,35	4,55
41 - 50	2	4	8,70	18,10	13,05	22,65
51 - 60	5	2	21,70	9,10	34,75	31,75
61 - 70	2	1	8,70	4,55	43,45	36,30
71 - 80	0	1	0,00	4,55	43,45	40,85
81 - 90	1	0	4,35	0,00	47,80	40,85
91 - 100	0	1	0,00	4,55	47,80	45,40
101 - 110	1	1	4,35	4,55	52,15	49,95
111 - 120	1	2	4,35	9,10	56,50	59,05
121 - 130	2	2	8,70	9,10	65,20	68,15
131 - 140	1	1	4,35	4,55	69,55	72,70
141 - 150	1	0	4,35	0,00	73,90	72,70
151 - 160	1	1	4,35	4,55	78,25	77,25
161 - 170	2	1	8,70	4,55	86,95	81,80
171 - 180	2	1	8,70	4,55	95,65	86,35
181 - 190	0	3	0,00	13,65	100,00	100,00
191 - 200	1	0	4,35	0,00		

Abb. 4 Häufigkeitsverteilung für AP innerhalb der Blutgruppen A und O im Wahrscheinlichkeitsnetz entsprechend Tabelle 4

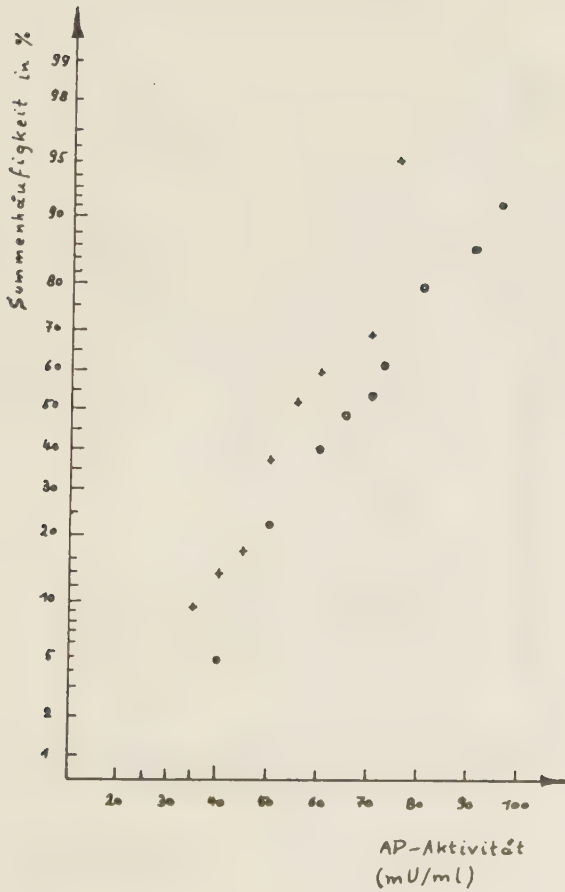
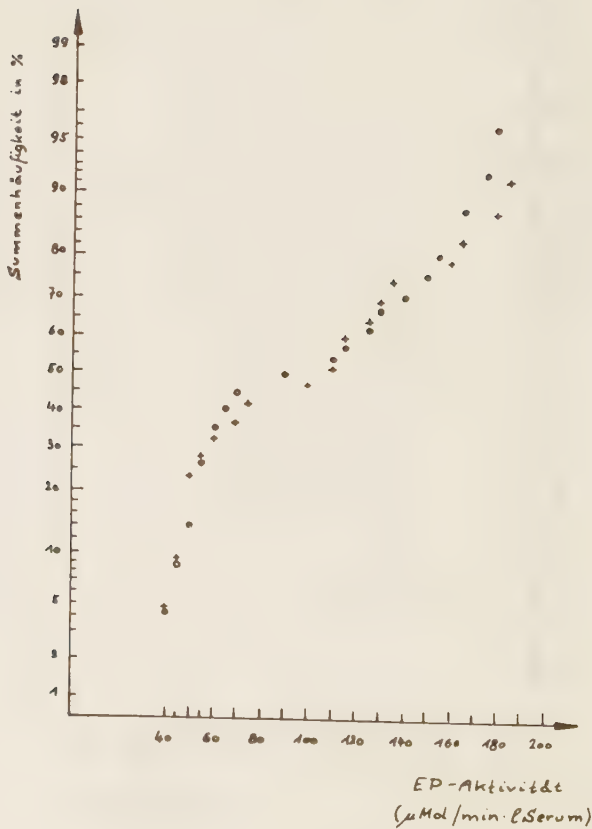


Abb. 5 Häufigkeitsverteilung für EP innerhalb der Blutgruppen A und O im Wahrscheinlichkeitsnetz entsprechend Tabelle 5



f) Enzymaktivitäten von AP und EP im Vergleich bei Leberzirrrose und akuter Hepatitis

In Bezug auf die Meßergebnisse für AP und EP bei den 59 lebergesunden Versuchspersonen sind die Aktivitätsbestimmungen der nämlichen Enzyme bei Leberzirrrose und akuter Hepatitis in mehrfacher Hinsicht auffällig (Tabelle 6).

Tabelle 6 AP und EP Aktivitäten bei Patienten mit
Leberzirrrose und akuter Hepatitis

Zirrhosen			Hepatitisiden		
Patient	AP	EP	Patient	AP	EP
Mer.G.	131	9	Gra.K.	60	53
Bet.G.	275	21	Rich.I.	71	56
Hab.K.	317	29	Koff.	136	71
Rau.S.	152	32	Röm.H.	87	91
Kör.S.	390	38	Fie.R.	126	102
Sch.H.	218	85	Böh.F.	98	120
Röd.O.	300	105	Lan.V.	220	182
Sch.R.	196	105	Tri.H.	141	217
Pol.H.	120	124			

Leberzirrhose:

Die AP-Werte aller 9 Zirrhose-Patienten liegen über dem Normalbereich (34 - 100 mU/ml). 5 Werte (= 55 %) betragen mehr als das zweifache des oberen Normwertes.

Dagegen sind die EP-Werte, verglichen mit der gefundenen Norm (36 - 191 mMol/Min · l Serum), auffallend niedrig: denn bei 4 Patienten (= 44 %) erreicht die EP nicht die untere Normgrenze, und kein Wert liegt im hohen Meßbereich.

Dieses unterschiedliche Verhalten bekräftigt das Fehlen einer Beziehung zwischen beiden Enzymen.

Gleichzeitig ergibt sich aus diesem Vergleich die Frage, ob die EP-Messung im Serum nicht als eine besondere Funktionsprüfung für das Ausmaß intakten Leberparenchyms bewertet werden kann.

Hepatitis:

Das für Zirrhose gefundene gegensätzliche Verhalten von AP und EP ist bei Hepatitis anhand unserer Patienten nicht nachzuweisen. Die Werte für AP liegen hier nur teilweise geringfügig über der Norm, während für die EP alle drei Enzymaktivitätsgruppen vertreten sind.

F) Diskussion

Unsere Meßergebnisse schließen einen Einfluß der alkalischen Phosphatase auf den Abbau von E 600 aus. Wir müssen noch fragen, ob das negative Resultat etwa durch die Methode verursacht sein könnte. Man kann dies mit Wahrscheinlichkeit verneinen, denn es gibt einige Arbeiten, welche sich mit dem Methodenvergleich bei der Messung der alkalischen Phosphatase befassen und die Proportionalität verschiedener Meßverfahren aufzeigen:

So wiesen Laurent und Norberg (1960) eine lineare Beziehung zwischen den Methoden Bessey-Lowry-Brock (1946) und King-Armstrong (1934) nach. Schwartz, Kessler und Bodansky (1960) zeigten das lineare Verhalten der Bodansky-Methode (1933) und der King-Armstrong-Methode auf. Deren, Williams, Muench, Chalmers und Zamchek (1964) konnten durch Vergleichsmessungen nachweisen, daß die Aktivitäten der alkalischen Serumphosphatase nach Bodansky, nach King-Armstrong und nach Bessey-Lowry-Brock einander entsprechen.

Die Substrate der erwähnten Meßmethoden sind:

Beta-Glyzerophosphat bei der Bodansky-Methode,
Phenylphosphat bei der King-Armstrong-Methode und
p-Nitrophenylphosphat bei der Bessey-Lowry-Brock-Methode.

Unser Ergebnis sagt also aus, daß die alkalische Phosphatase als Orthophosphorsäuremonoester-Phosphohydrolase (3.1.3.1. Florkin und Stotz, 1964) auf den Abbau eines Orthophosphorsäuretriesters wie E 600 keinen Einfluß hat, gleichviel, welche Nachweismethode angewandt wird.

Denn die von Hausamen und Mitarb. (1967) angegebene und in unseren Versuchen angewandte Methode zur Bestimmung der alkalischen Phosphatase stellt mit seiner kinetischen Durchführung eine Weiterentwicklung des Meßverfahrens von Bessey, Lowry und Brock (1946) dar.

Es bleibt noch der substratabhängige Nachweis von Isoenzymen der alkalischen Phosphatase zu erwähnen.

Der mit L-Phenylalanin hemmbare Anteil der AP (LPSAP) stammt größtenteils aus der intestinalen Mukosa und reagiert auf Fettdiät mit einem Anstieg im Serum (Langman und Mitarb. (1966). Diese Aktivitätszunahme der AP dürfte demnach auch bei unseren Versuchen mit fettreicher Mahlzeit erfolgt sein. Um sie zu erfassen, wies sich jedoch das Substrat p-Nitrophenylphosphat als unbrauchbar. Auch It-Koon und Moss (1969) zeigten, daß p-Nitrophenylphosphat zum Nachweis der LPSAP weniger gut geeignet sei als Phenylphosphat. Unsere Feststellung, daß keine Parallellität zwischen EP- und AP-Aktivität besteht, wird aber von dieser Substratabhängigkeit des Phosphatasennachweises nicht berührt; denn im Falle einer Aktivierung des intestinalen Phosphatasen-Isoenzyms durch Fettdiät nahm dieses keinen Einfluß auf den Abbau von E 600.

Unsere Versuche führten zu weiteren Beobachtungen.

Vergleicht man unsere Meßwerte für die Aktivität der E 600-Phosphatase, so ergeben sich gleicher Gesamtmeßbereich und gleicher Teilmeßbereich für die Gruppe mit niedriger Aktivität.

Während aber Krisch (1968) nur zwei sich überlagernde Aktivitätsbereiche diskutiert, zeichnen sich aufgrund

unserer Ergebnisse drei voneinander trennbare Meßbereiche ab. Das Fehlen einer scharfen Trennung zwischen der zweiten und dritten Gruppe läßt daran denken, daß bereits geringe Dosierungsschwankungen bei Seren mit hoher Aktivität zu größeren Meßwertabweichungen führen, als bei Seren mit niedriger Aktivität.

Da Aldridge (1953) in der Mäuseleber eine besonders hohe EP-Aktivität fand und Krisch (1966) eine mit EP angereicherte mikrosomale Fraktion in der Schweineleber antraf, kann man auch in der menschlichen Leber einen wesentlichen Syntheseort für die ins Serum gelangende EP vermuten. Es könnten daher fibrotische Veränderungen und Parenchymverlust der Leber, wie sie bei Leberzirrhose im Unterschied zur akuten Hepatitis gegeben sind, den beträchtlichen Aktivitätsverlust der EP bei unseren Probanden mit Leberzirrhose verständlich machen. Eine tatsächliche Beziehung zwischen EP-Aktivität und Leberzirrhose bleibt aber wegen der kleinen Zahl der untersuchten Patienten fraglich. Für umfangreichere Untersuchungen an Leberzirrhotikern kommt den bisherigen Ergebnissen orientierende Bedeutung zu.

G) Zusammenfassung

Zwischen der alkalischen Phosphatase (AP), gemessen mit p-Nitrophenylphosphat als Substrat, und der E 600 spaltenden Phosphatase (EP) des menschlichen Serums ergibt sich keine Beziehung.

Nach einer fettreichen Diät kommt es zu keinem Anstieg der mit p-Nitrophenylphosphat bestimmbaren alkalischen Phosphatase, und auch die E 600-Phosphatase behält eine konstante Aktivität bei. Auch die Versuchspersonen mit den Blutgruppen O und B hatten nach der fettreichen Probemahlzeit eine konstante Aktivität beider Enzyme.

Die Meßwerte für die EP bei 59 gesunden nicht verwandten Versuchspersonen lassen eine Gruppierung in drei Aktivitätsbereiche erkennen.

Von orientierendem Wert sind die Ergebnisse, daß bei Leberzirrhose die EP-Aktivität des Serums deutlich absinkt und bei akuter Hepatitis dieselbe im Normbereich bleibt.

H) L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

1. Aldridge, W.N.
Serum esterase. 1. Two types of esterase
(A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate,
propionate and butyrate, and a method for
their determination.
Biochem. J. 53, 110 (1953; 1)
2. Aldridge, W.N.
Serum esterase. 2. An enzyme, hydrolysing
diethyl-p-nitrophenyl phosphate (E 600) and its
identity with the A-Esterase of mammalian sera.
Biochem. J. 53, 117 (1953; 2)
3. Augustinsson, K.B. and Heimbürger, G.
Enzymatic hydrolysis of organphosphorus compounds.
IV. Specificity studies.
Acta Chem. Scand. 8, 1533 (1954)
4. Bamford, K.F., Harris, H., Luffman, J.E.
Robson, E.B. and Cleghorn, T.E.
Serum alkaline phosphatases and the ABO
blood groups.
Lancet I, 530 (1965)
5. Baumgartner, W.
Untersuchungen über einen Zusammenhang zwischen
fermentativem E 600-Abbau und Vergiftung der
Cholinesterase durch E 600 im menschlichen Serum.
Dissertation Erlangen 1970

6. Beckman, L.
Association between human serum alkaline phosphatase and blood groups.
Acta genet. Statist. Med. 14, 286 (1964)
7. Bessey, O.A., Lowry, O.H. and Brock, M.
A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum.
J. Biol. Chem. 164, 321 (1946)
8. Bodansky, A.
Phosphatase studies. II. Determination of serum phosphatase factors influencing the accuracy of the determination.
J. Biol. Chem. 101, 93 (1933)
9. Deren, J.J., Williams, L.A., Muench, H., Chalmers, T. and Zamcheck, N.
Comparative study of four methods of determining alkaline phosphatase.
New Engl. J. Med. 270, 1277 (1964)
10. Fishman, W.H., Green, S. and Inglis, N.I.
Organ-specific behaviour exhibited by rat intestine and liver alkaline phosphatase.
Biochem. Biophys. Acta 62, 363 (1962)
11. Fishman, W.H. and Kreisher, J.H.
Stereospecific, organ-specific inhibition of intestinal alkaline phosphatase.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 103, 951 (1963)
12. Fishman, W.H. and Ghosh, N.K.
Isoenzymes of human alkaline phosphatase.
Advances in Clinical Chemistry 10,
Edited by Bodansky, O. and Stewart, C.P.
Academic Press, Inc. New York (1967)

13. Florkin, M. und Stotz, E.H.
Report of the Commission on Enzymes of the IUB.
Comprehensive Biochemistry 13, S. 6
Elsevier Publishing Comp., New York (1964)
14. Friedberg, K.D. und Sakai, P.
Spezifischer Nachweis von Vergiftungen mit Alkylphosphaten (E 600, E 605, Systox) in Blut und Hirngewebe mit Hilfe eines fermentreaktivierenden Antidots (Pyridin, Aldoxim-Methjodid, PAM).
Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. 47, 580 (1958)
15. Friedberg, K.D. und Erdmann, W.D.
Spontane Reaktivierung der durch Alkylphosphate (Paraoxon, Systox, Isqsystox) blockierten Cholinesterase in vitro.
Arch. exp. Path. u. Pharmacol. 237, 1 (1959)
16. Geldmacher-v.Mallinckrodt, M., Rabast, U. und Lindorf, H.H.
Unterschiedliche Reaktion menschlicher Serum-Cholinesterasen mit E 600 (O,O-Diäthyl-O-(p-nitrophenyl)-phosphat.
Arch. Toxikol. 23, 223 (1969)
17. Geldmacher-v.Mallinckrodt, M. und Lindorf, H.H.
Unterschiedliche Reaktion menschlicher Serum-Cholinesterasen mit Alkylphosphaten.
Vortrag auf der 48. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin in Berlin v. 6.-9.10.1969
- 17a Geldmacher-v.Mallinckrodt, M., Baumgartner, W., Burgis, H. und Metzner H.
in Vorbereitung
18. Gould, B.S.
The action of "alkaline" phosphatase.
J. Biol. Chem. 156, 365 (1944)

19. Hausamen, T.U., Rick, W., Gross, W. und Helger, R.
Optimal conditions for the determination of serum alkaline phosphatase by a new kinetic method.
Clin. Chim. Acta 15, 241 (1967)
20. It-Koon, T. and Moss, D.W.
The estimation of intestinal alkaline phosphatase in human blood serum.
Clin. Chim. Acta 25, 117 (1969)
21. Keiding, N.R.
Intestinal alkaline phosphatase in human lymph and serum.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 18, 134 (1966)
22. Kewitz, H.
Die Wiederherstellung der Cholinesterase-aktivität bei der Alkylphosphat-Vergiftung durch ein spezifisches Antidot.
Klin. Wschr. 35, 521 (1957)
23. King, J., and Armstrong, A.R.
A convenient method for determining serum and bile phosphatase activity.
Can. Med. Assoc. J. 31, 376 (1934)
24. Krisch, K.
Reaction of a microsomal esterase from hog-liver with diethyl p-nitrophenyl phosphate.
Biochem. Biophys. Acta 122, 265 (1966)
25. Krisch, K.
Enzymatische Hydrolyse von Diäthyl-p-nitrophenylphosphat (E 600) durch menschliches Serum.
Z. klin. Chem. klin. Biochem. 6, 41 (1968)

26. Langman, M.J.S., Leuthold, E., Robson, E.B.
Harris, J., Luffman, J.E. and Harris, H.
Influence of diet on the "intestinal" component
of serum alkaline phosphatase in people of dif-
ferent ABO blood groups and secretor status.
Nature 212, 41 (1966)
27. Langman, M.J.S., Constantinopouloulos, A. and
Bouchier, I.A.D.
ABO blood groups, secretor status, and intesti-
nal mucosal concentrations of alkaline phosphatase.
Nature 217, 863 (1968)
28. Laurent, B. and Norberg, B.
Phosphatase assay in serum with
p-nitrophenyl phosphate as substrate.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 12, 154 (1960)
29. Main, A.R.
The purification of the enzyme hydrolysing
diethyl p-nitrophenyl phosphate(paraoxon)
in sheep serum.
Biochem. J. 74, 10 (1960)
30. Main, A.R.
The differentiation of the A-Type Esterase
in sheep serum.
Biochem. J. 75, 188 (1960)
31. Plosscowe, R.P., Berg, G.C. and Segal, H.H.
Enzyme histochemical studies of human
gastric and jejunal biopsy specimens
in normal and disease states.
Am. J. Digest. Diseases 8, 311 (1963)

32. Roche, J.
Phosphatases.
in: "The Enzymes" Bd.I, Teil 1, S. 473
Herausg. J.B. Summer und K. Myrbäck
Academic Press, New York 1950
33. Schwartz, M.K., Kessler, G. and
Bodansky, O.
Comparison of serum alkaline phosphatase
activities determined with sodium beta-
glycerophosphate and sodium phenyl-
phosphate as substrates,
Am. J. Clin. Pathol. 33, 275 (1960)
34. Shreffler, D.C.
Relationship of alkaline phosphatase level
in intestinal mucosa to ABO and secretor
blood groups.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 123, 423 (1966)
35. Skrinjaric-Spoljar, M. and Reiner E.
Hydrolysis of diethyl-p-nitrophenyl-phosphate
and ethyl-p-nitrophenyl-ethylphosphonate by
human sera.
Biochem. Biophys. Acta 165, 289 (1968)

L e b e n s l a u f

Am 19.5.1941 wurde ich, Thomas Schewior, als Sohn des Gutsinspektors Siegfried Schewior und seiner Ehefrau Ursula, geborene Pohl, in Grünweide im Kreis Cosel/OS geboren. Mein Vater blieb in russischer Gefangenschaft vermißt, meine Familie lebt seit der Vertreibung im Jahre 1945 in der Nähe von Regensburg. Nach dem Besuch der Volksschulen in Sulzbach und Donaustauf an der Donau ging ich 1952 an das neusprachliche Realgymnasium "Neues Gymnasium" in Regensburg und legte dort 1961 das Abitur ab. Dem 18-monatigen Grundwehrdienst bei der Bundeswehr folgte für das Wintersemester 1963/64 die Immatrikulation zum Medizinstudium an der Universität Erlangen-Nürnberg, das ich dort im Sommer 1969 mit dem medizinischen Staatsexamen abschloß. Zwischenzeitlich verbrachte ich zwei klinische Semester an der Universität Montpellier.

Von August 1969 bis April 1970 war ich Medizinalassistent am Institut für gerichtliche Medizin und Kriminalistik der Universität Erlangen-Nürnberg. Hier erhielt ich von Frau Prof. Geldmacher-v.Mallinckrodt das Thema für die Promotion.

Im Februar 1970 legte ich zusätzlich das amerikanische medizinische Examen für ausländ. Graduierte ab.

Von Mai bis Dezember 1970 war ich Medizinalassistent am Krankenhaus St. Josef in Regensburg.

Gegenwärtig arbeite ich als Assistenzarzt auf der Chirurgischen Abteilung der Städtischen Kinderklinik in Regensburg.

Herrn Professor Dr. Dr. E. Weinig möchte ich für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes in seinem Institut meinen besten Dank aussprechen.

Besonders herzlich danke ich Frau Professor Dr. Dr. M. Geldmacher-v. Mallinckrodt für die Überlassung des Themas, für ihre große Hilfsbereitschaft und den stets so freundlich erteilten Rat.

Die dankenswerte Bereitwilligkeit unserer Probanden, der Patienten ebenso wie der Studenten, und desgleichen das Entgegenkommen der Universitätsmensa-Leitung erleichterten uns die experimentelle Arbeit sehr.

Bei Frau Petenyi bedanke ich mich vielmals für ihre besondere Hilfsbereitschaft bei der Erörterung statistischer Fragen.

